动 物 学 研 究 2001, Dec. 22 (6): 433~436
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

Sepharose 4B 一步法对金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 的分离纯化

查红光 张 云[①]
(中国科学院昆明动物研究所 昆明 650223)

摘要：利用经酸处理的 Sepharose 4B 为层析介质，以含 0.2 mol/L 半乳糖，pH7.4 台氏液作为洗脱液，从广西产金环蛇(*Bungarus fasciatus*)蛇毒中一步分离得到一种磷脂酶 A_2。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其分子量为 14 kDa。N 端部分序列测定表明，所分离得到的磷脂酶 A_2 其 N 端 16 个氨基酸残基序列与已报道的金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 同功酶Ⅵ(Lu & Lo, 1978)一致。该酶糖含量较高，为 13.4%；具有弱的磷脂酶 A_2 活性，无毒，也无溶血和出血毒活性。

关键词：金环蛇；磷脂酶 A_2；Sepharose 4B
中图分类号：Q959.6+2，Q55 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2001)06-0433-04

磷脂酶 A_2(phospholipase A_2, EC 3.1.1.4，简称为 PLA_2)能催化甘油磷脂的第 2 位脂酰键水解，生成溶血磷脂和游离脂肪酸。磷脂酶 A_2 在生物体内广泛分布，在许多重要的生命活动中如脂类消化、细胞质膜代谢、信号传导、炎症发生和免疫防御等发挥着重要作用。按照磷脂酶 A_2 的来源可以分为外分泌性磷脂酶 A_2($sPLA_2$)和胞质性磷脂酶 A_2($cPLA_2$)(Kramer *et al*., 1986)。其中 $sPLA_2$ 是小分子量的水溶性蛋白质(一般分子量在 14 kDa 左右)，它主要存在于动物的胰脏和蛇的毒液中，在蛇毒中含量较高。根据分子中的二硫键的配对方式，蛇毒磷脂酶 A_2 被分为眼镜蛇蛇毒及海蛇蛇毒磷脂酶 A_2、蝰蛇蛇毒和响尾蛇蛇毒磷脂酶 A_2 两类(Dufton & Hider, 1983)。蛇毒磷脂酶 A_2 由于来源广泛，又具有特殊的药理、毒理和生化性质，热稳定性好，而受到人们的广泛重视；因而对其基因序列、蛋白质序列和三维结构都进行过研究。

近年来针对磷脂酶 A_2 的作用机理、结构与功能的关系，尤其是在磷脂酶 A_2 的受体和抑制剂方面有过不少报道。已报道的磷脂酶 A_2 受体、结合蛋白和抑制剂均为糖蛋白(Valentin & Lambeau, 2000; Ancian *et al*., 1995; Hains *et al*., 2000)。而对磷脂酶 A_2 的糖基结合活性及其功能意义研究较少。有文献(Diccianni *et al*., 1990, 1991; Dua & Cho, 1994; Lomonte *et al*., 1994)报道肝素可以抑制多种磷脂酶 A_2 的活性，并认为这种抑制是由于肝素与磷脂酶 A_2 酶蛋白结合而阻碍了磷脂酶 A_2 与受体的结合。但对于肝素与磷脂酶 A_2 结合的方式和结合位点并不十分清楚(Selistre de Araujo *et al*., 1996)。Fujita *et al*.(1995)认为来源胰脏的磷脂酶 A_2 与受体的结合是以受体表面寡糖基的特异识别方式结合，麦胚凝集素(WGA)可以抑制磷脂酶 A_2 与受体的结合。尽管对于蛇毒磷脂酶 A_2 还未见类似的报道，笔者假设蛇毒磷脂酶 A_2 有糖基结合活性，并参照 Ogilvie *et al*.(1986)分离蛇毒凝集素的方法，从金环蛇蛇毒中分离磷脂酶 A_2，获得了 1 个纯的蛋白质组分，经鉴定为金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2。现将其结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

金环蛇蛇毒由广西医科大学提供。Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品，D-半乳糖为 Amersco 公司产品，电泳超低分子量标记为 Sigma 公司产品，PVDF 膜为 Perkin Elmer 公司产品，卵磷脂为上海禽蛋二厂产品，其他试剂均为 Sigma 公司产品或国产分析纯。

收稿日期：2001-06-15；修改稿收到日期：2001-07-11
基金项目：中国科学院"十五"计划预研项目资助课题
①通讯联系人，E-mail：zhangy@mail.kiz.ac.cn

1.2 纯化步骤

将0.5 g金环蛇蛇毒冰冻干粉溶于10 mL台氏液中(8 g NaCl,0.05 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$,1 g $NaHCO_3$,0.02 g $CaCl_2$,0.1 g $MgCl_2$,0.2 g KCl/L,pH7.4),离心后取上清上酸处理过Sepharose 4B柱(1.8 cm×20 cm,经台氏液平衡),流速0.15 mL/min。先用台氏液洗去杂蛋白,再用含0.2 mol/L半乳糖的台氏液洗脱,收集洗脱峰后,对水透析,冰冻干燥。干粉于-20℃保存。由于半乳糖在280 nm处有较高吸光值,峰均依照在220 nm处的吸光值(使用Perkin Elmer公司Lambda Bio 40型分光光度计)收集。

1.3 蛋白质含量测定

采用Bradford法(Darbre, 1986),以牛血清白蛋白为标准。

1.4 SDS-PAGE电泳分析及分子量测定

为了使小分子蛋白质有较好的分辨率,SDS-PAGE在Tris-Tricine缓冲系统中进行(Schagger & Jagow,1987),以超低分子量蛋白质标记作为参照,电泳后凝胶用考马斯亮兰G-250进行染色。

1.5 N末端序列测定及序列相似性搜索

将聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质经电转移到PVDF膜上,剪下被染色确定的条带。于蛋白质序列分析仪(ABI, 476A型)中进行序列分析。

用Blast程序将N末端氨基酸序列测定结果输入Genbank中进行序列相似性搜索,并对搜索返回结果进行分析。

1.6 样品总糖含量测定

采用硫酸苯酚法测定对水彻底透析过(直至透析液中检测不到糖)的样品中的总糖含量,以半乳糖为标准(张惟杰,1987)。

1.7 磷脂酶A_2活性测定及半乳糖对磷脂酶A_2活性的抑制

以卵磷脂为反应底物,用0.01 mol/L KOH溶液滴定由酶反应所释放出的游离脂肪酸。在酶反应初速度阶段计算酶活力。酶比活力单位为每分钟每毫克蛇毒释放出的游离脂肪酸微摩尔数(Kawauchi *et al*., 1971)。

于上述反应混合物(总体积10mL)中加入D-半乳糖至浓度为10 mg/mL,并加入待测磷脂酶A_2样品200 μg,再用上述方法测定样品的磷脂酶A_2活力。

1.8 其他活性测定

急性毒性试验使用(20±2) g昆明种小鼠,对不同试验组(每组4只,雌雄各2只)腹腔注射50~250 μg不同剂量待测样品;直接和间接溶血活性测定以小鼠及兔的红细胞为底物,并参照Shiomi *et al*.(1998)的方法;出血毒活性测定参照Fuly *et al*.(2000)的方法。

2 结 果

2.1 磷脂酶A_2的分离纯化

经含0.2 mol/L半乳糖的台氏液洗脱,结果得到一洗脱峰,层析图谱见图1。收集洗脱峰,并对水进行彻底透析。透析后体积为45 mL。经测定蛋白质浓度为68.8 μg/mL,即从0.5 g粗毒中获得3.1 mg蛋白质样品,得率为0.62%。

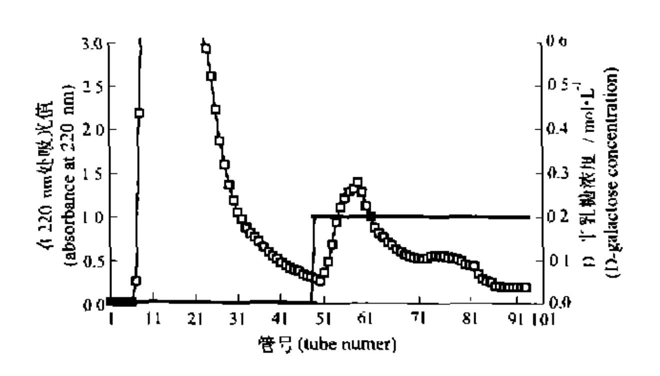


图1 用Sepharose 4B柱分离金环蛇蛇毒亲和层析图谱

Fig.1 Affinity chromatogram of the venom of *Bungarus fasciatus* on Sepharose 4B column

柱体积:1.8 cm×20 cm;流速:0.15 mL/min;每管体积:3 mL;-□-□-220 nm处吸光值;——洗脱液中半乳糖浓度(mol/L)。
Column volume: 1.8×20 cm; flow rate: 0.15 mL/min; liquid volume of each tube: 3 mL; -□-□- absorbance at 220 nm; —— galactose concentration in eluant (mol/L).

SDS-PAGE结果见图2。经染色后,样品在还原和非还原条件下均为1条带,说明该样品较纯且以单体形式存在。该样品在非还原条件下泳动速度较慢,电泳条带位置也相应比较靠后,这个结果与Tsai *et al*.(1995)所报道的蛇毒磷脂酶A_2在非还原条件下会发生聚集或泳动较慢的结果是一致的。根据样品在还原条件下电泳条带所在胶上位置与分子量标记相比较,得出该蛋白质分子量约为14 kDa。

测定该纯化组分蛋白质N末端的16个氨基酸序列的顺序为:N-L-Y-Q-F-K-N-M-I-E-C-A-G-T-R-T。

该末端序列使用Blast程序于Genbank进行相似性搜索后,结果与从金环蛇蛇毒分离的磷脂酶A_2同功酶Ⅵ(Lu & Lo, 1978) N末端的16个氨基



图 2　所纯化的磷脂酶 A_2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.2　SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified PLA_2

1. 超低分子量标记：丙糖磷酸异构酶（来源于兔肌肉，26.6 kDa）；肌球蛋白（来源于马心脏，17 kDa）；α－白蛋白（来源于牛奶，14.2 kDa）；胰蛋白酶抑制剂（来源于牛肺，6.5 kDa）。2. 经还原处理后的纯化磷脂酶 A_2。3. 非还原处理的纯化磷脂酶 A_2。

Lane 1, ultra-low range molecular weight marker: Triosephosphate isomerase from rabbit muscle (26.6 kDa); Myoglobin from house heart (17 kDa); α-lactalbumin from bovine milk (14.2 kDa); Aprotinin from bovine lung (6.5 kDa). Lane 2, the purified PLA_2 (reducing conditions). Lane 3, the purified PLA_2 (non-reducing conditions).

酸序列一致。

2.2　磷脂酶 A_2 活性和总糖含量

所纯化组分具有弱的磷脂酶 A_2 活性，其比活力为 0.41。而当反应体系中存在较高浓度（10 mg/mL）的 D－半乳糖时，对酶活性没有抑制效应。经测定，所纯化蛋白组分不具有溶血和出血活性，对小鼠几乎无毒。蛋白质浓度为 0.77 mg/mL，并且已对水彻底透析的样品，经硫酸苯酚法测定其中总糖含量为 0.12 mg/mL，即样品总糖含量为 13.4%（w/w）。

3　讨　论

蛇毒凝集素是典型的可以识别并结合糖基的小分子蛋白质，然而眼镜蛇科的蛇毒中几乎不含有凝集素（Gartner & Ogilvie, 1984）。本研究得到的具有弱的磷脂酶 A_2 活性的蛋白质，其 N 末端 16 个氨基酸的序列与已报道的金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 同功酶Ⅵ（Lu & Lo, 1978）一致，但两者是否是同一金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2，还有待进一步实验证实。所纯化磷脂酶 A_2 虽然经过彻底透析，但其含糖量仍为 13.4%（w/w），而从蜂毒中纯化的磷脂酶 A_2 糖含量为 20%～40%（w/w）（Costa & Palma, 2000; Oliveira & Palma, 1998）。尽管有较高的糖含量，但并没有影响蛋白质在 SDS-PAGE 中的迁移速率及蛋白质染色。这一结果与 Oliveira & Palma（1998）报道的蜂毒磷脂酶 A_2 的结果一致。

对于磷脂酶 A_2 如何与糖基作用，至今尚未见详细的报道。Dua & Cho（1994）、Lomonte *et al*.（1994）认为，肝素与磷脂酶 A_2 结合而影响其活性，是因为静电相互作用，而不是因为对糖基的特异识别结合所致。本实验结果显示蛇毒磷脂酶 A_2 具有糖基结合活性，并可以通过糖基结合活性加以分离。在一种蛇毒中往往含有磷脂酶 A_2 的多种同功酶，仅在金环蛇蛇毒中不同的全序列已被测定的磷脂酶 A_2 就有 6 种（Lu & Lo, 1978, 1981; Liu *et al*., 1988, 1989, 1992）。但笔者利用 Sepharose 4B 柱吸附，用半乳糖溶液洗脱仅得到了其中的 1 种磷脂酶 A_2，而 Sepharose 4B 的主要成分为多聚半乳糖。这一结果证明磷脂酶 A_2 不仅具有对糖基识别结合的能力，而且具有一定的特异性。笔者所分离的金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 就可能对半乳糖有特异性结合功能。在磷脂酶 A_2 活性测定过程中，加入一定量的半乳糖并不能抑制本研究所分离的磷脂酶 A_2 的活性，有可能是酶与半乳糖的结合位点与酶的活性中心未发生重叠的缘故。当然这一推论需要更为细致的工作来加以证实。因此，我们的实验结果不仅仅是提出了一种分离磷脂酶 A_2 新的且更为简单的方法，更重要的是它显示了蛇毒磷脂酶 A_2 具有的糖结合活性和可能的糖结合特异性。这对于进一步研究磷脂酶 A_2 作用机理、结构与功能关系和受体作用机制等都具有重要意义。

参　考　文　献

Ancian P, Lambeau G, Lazdunski M, 1995. Multifunction activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipase A_2[J]. *Biochemistry*, **34**: 13146－13151.

Costa H, Palma M S, 2000. Agelotoxin: a phospholipase A_2 from the venom of the neotropical social wasp cassununga (*Agelaia pallipes pallipes*) (Hymenoptera: Vespidae)[J]. *Toxicon*, **38**: 1367－1379.

Darbre A, 1986. Analytical Methods in Practical Protein Chemistry: A Handbook[M]. New York: John Wiley and Sons. 227－335.

Diccianni M B, Mistry M J, Hug K *et al*, 1990. Inhibition of phospholipase A_2 by heparin[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1046**: 242－248.

Diccianni M B, Lilly-Stauderman M, McLean L R *et al*, 1991. Heparin prevents the binding of phospholipase A_2 to phospholipid micelles: importance of the amino-terminus[J]. *Biochemistry*, **30**: 9090－9097.

Dua R, Cho W, 1994. Inhibition of human secretory class Ⅱ phospholipase A_2 by heparin[J]. *Eur. J. Biochem.*, **221**: 481 - 490.

Dufton M J, Hider R C, 1983. Classification of phospholipase A_2 according to sequence: Evolutionary and pharmacological implications[J]. *Eur. J. Biochem.*, **137**: 545 - 551.

Fujita H, Kawamoto K, Hanasaki K *et al*, 1995. Glycosylation-dependent binding of pancreatic type I phospholipase A_2 to its specific receptor [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **209**: 293 - 299.

Fuly A L, Calil-Elias S, Zingali R B *et al*, 2000. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A_2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom[J]. *Toxicon*, **38**: 961 - 972.

Gartner T K, Ogilvie M L, 1984. Isolation and characterization of three Ca^{2+} dependent beta-galactoside-specific lectins from snake venoms [J]. *Biochem. J.*, **224**: 301 - 307.

Hains P G, Sung K L, Tseng A *et al*, 2000. Functional characteristics of a phospholipase A_2 inhibitor from *Notechis ater* serum[J]. *J. Biol. Chem.*, **260**: 9742 - 9749.

Kawauchi S, Iwanaga S, Samejima Y *et al*, 1971. Isolation and characterization of two phospholipase A's from the venom of *Agkistrodon lays blomhoffii* [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **236**: 142 - 160.

Kramer R M, Cheeam G C, Deykin A *et al*, 1986. Solubilization and properties of Ca^{2+}: dependent human platelet phospholipase A_2 [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **878**: 394 - 403.

Liu C S, Chang C S, Leu H L, *et al*, 1988. The complete amino-acid sequence of basic phospholipase A_2 in the venom of *Bungarus fasciatus* [J]. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **369**: 1227 - 1233.

Liu C S, Leu H L, Chang C S *et al*, 1989. Amino acid sequence of a neutral phospholipase A_2 (Ⅲ) in the venom of *Bungarus fasciatus* [J]. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**: 257 - 261.

Liu C S, Kuo P Y, Chen J M *et al*, 1992 Primary structure of an inactive mutant of phospholipase A_2 in the venom of *Bungarus fasciatus* (banded krait)[J]. *J. Biochem.*, **112**: 707 - 713.

Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A *et al*, 1994. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin Ⅱ, a lysine 49 phospholipase A_2 from *Bothrops asper* snake venom: Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling[J]. *J. Biol. Chem.*, **269**: 29867 - 29873.

Lomonte B, Tarkowski A, Bagge U *et al*, 1994. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A_2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family[J]. *Biochem. Pharmacol.*, **47**: 1509 - 1518.

Lu H S, Lo T B, 1978. Complete amino acid sequence of a new type of cardiotoxin *Bungarus fasciatus* venom[J]. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **12**: 181 - 183.

Lu H S, Lo T B, 1981. Complete amino acid sequences of two cardiotoxin-like analogues from *Bungarus fasciatus* (banded krait) snake venom [J]. *Toxicon*, **19**: 103 - 111.

Ogilvie M L, Dockter M E, Wenz L *et al*, 1986. Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii* [J]. *J. Biochem.* (Tokyo), **100**: 1425 - 1431.

Oliveira M R, Palma M S, 1998. Polybitoxins: a group of phospholipases A_2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*)[J]. *Toxicon*, **36**: 189 - 199.

Schagger H, Jagow G von, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. *Anal. Biochem.*, **166**: 368 - 379.

Selistre de Araujo H S, White S P, Ownby C L, 1996 cDNA cloning and sequence analysis of a lysine 49 phospholipase A_2 myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom[J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, **326**: 21 - 30.

Shiomi K A, Kazama A, Shimakura K *et al*, 1998. Purification and properties of phospholipases A_2 from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom[J]. *Toxicon*, **36**: 589 - 599.

Tsai I H, Lu P J, Wang Y M *et al*, 1995. Molecular cloning and characterization of a neurotoxic phospholipase A_2 from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus ucrosquamatus*)[J]. *Biochem. J.*, **311**: 895 - 900.

Valentin E, Lambeau G, 2000. Increasing molecular diversity of secreted phospholipase A_2 and their receptors and binding proteins [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1488**: 59 - 70.

Zhang W J, 1987. The Biochemical Research Technology of Complex Carbohydrates[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House. 7. [张惟杰, 1987. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社. 7.]

Purification of a Phospholipase A_2 from *Bungarus fasciatus* Venom by One Step Sepharose 4B Method

ZHA Hong-Guang ZHANG Yun[①]

(*Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*)

Abstract: By one step affinity chromatography (acid treated Sepharose 4B as matrix, tyrode solution containing 0.2 mol/L D-galactose as eluting solution), a phospholipase A_2 was isolated from *Bungarus fasciatus* venom. Its partial N-terminal sequence is identical to previously reported *Bungarus fasciatus* venom phospholipase A_2 isozyme Ⅵ (Lu & Lo, 1978). This phospholipase A_2 has only weak phospholipase A_2 activity, no hemolytic nor hemorrhage activity. The enzyme exists as monomer and its molecular weight is 14 kDa, and has a relatively high carbohydrate content (13.4% w/w).

Key words: *Bungarus fasciatus*; Phospholipase A_2; Sepharose 4B

①Corresponding author, Fax: 86 - 871 - 5191823; Tel: 86 - 871 - 5194279; E-mail: zhangy@mail.kiz.ac.cn